

⑬ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ Offenlegungsschrift
⑪ DE 37 12985 A1

⑲ Aktenzeichen: P 37 12 985.6
⑳ Anmeldetag: 16. 4. 87
㉑ Offenlegungstag: 3. 11. 88

⑥ Int. Cl. 4:
C 12 N 15/00
C 07 K 15/00
A 61 K 37/02
// A 61 K 39/395

DE 37 12985 A1

⑦ Anmelder:
Hoechst AG, 6230 Frankfurt, DE

⑧ Erfinder:
Habermann, Paul, Dr., 6230 Frankfurt, DE

⑤ Bifunktionelle Proteine

Gentechnisch erhältliche bifunktionelle Proteine aus einem Interleukin-2 und einem Granulozyten-Makrophagen- »Colony Stimulating«-Faktor-Anteil weisen die biologische Aktivität beider Komponenten auf, zeichnen sich aber durch erhöhte Stabilität aus. Diese Proteine sind somit Arzneimittel, die für die Behandlung maligner Neubildungen geeignet sind.

DE 37 12985 A1

Patentansprüche

1. Bifunkti nelle Proteine, bestehend aus einem biologisch aktiven Interleukin-2 (IL-2)- und einem Granulo-
zyten-Makrophagen-"Colony Stimulating"-Faktor (GM-CSF)-Anteil.
2. Protein nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die beiden biologisch aktiven Protein-Anteile
über eine Brücke aus 1 bis etwa 12 genetisch codierbaren Aminosäuren verknüpft sind.
3. Protein nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Brücke der Formel (II)



entspricht, wobei x eine ganze Zahl von 1 bis 10 bedeutet und As eine genetisch codierbare Aminosäure mit Ausnahme von Cys ist.

4. Protein nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß das Brückenglied (AS)_x die Aminosäurenfolgn



bedeutet.

5. Protein nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß N-terminal der IL-2-Anteil und C-terminal der GM-CSF-Anteil angeordnet ist.

6. Verfahren zur Herstellung von bifunktionellen Proteinen nach Anspruch 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß man ein für diese Proteine codierendes Gen konstruiert und in einer Wirtszelle exprimiert.

7. Arzneimittel, bestehend aus einem Protein nach Anspruch 1 bis 5, gegebenenfalls in Kombination mit einem pharmakologisch geeigneten Träger.

Beschreibung

Interleukin-2, im folgenden IL-2, wirkt als T-Zellwachstumsfaktor. IL-2 verstärkt die Aktivität von "Killer"-Zellen wie NK (Natural Killer)-Zellen, zytotoxischen T-Zellen und LAK (Lymphokine Activated Killer)-Zellen.

Granulozyten-Makrophagen-"Colony Stimulating"-Faktor, im folgenden GM-CSF, hingegen stimuliert die Granulozyten- und Makrophagenbildung aus hämatopoetischen Vorläuferzellen. Die Kombination der beiden biologischen Aktivitäten ist für die Tumorbehandlung mit und ohne Zytostatikagabe interessant. IL-2 und GM-CSF sind jedoch unterschiedlich stabil, was zu Problemen bei der direkten Verabreichung der beiden Komponenten und somit zu einer Verminderung des therapeutischen Erfolges führen kann.

Das Problem der unterschiedlichen Stabilität kann erfindungsgemäß dadurch gelöst werden, daß man diese beiden Proteine zu einem bifunktionellen Protein verknüpft.

Es wurden bereits Fusionsproteine der allgemeinen Formel



oder



zur gentechnischen Herstellung von gegebenenfalls modifiziertem GM-CSF vorgeschlagen, in denen X im wesentlichen die Aminosäurefolge der ersten etwa 100 Aminosäuren von vorzugsweise menschlichem IL-2 bedeutet, Y eine direkte Bindung bedeutet, falls die zum gewünschten Protein benachbarte Aminosäure oder Aminosäurefolge eine Abspaltung des gewünschten Proteins ermöglicht, oder andernfalls ein Brückenglied aus einer oder mehreren genetisch codierbaren Aminosäuren, das die Abspaltung ermöglicht, und Z eine Sequenz aus genetisch codierbaren Aminosäuren ist, die das gewünschte GM-CSF-Protein darstellt. Man kann hierbei auch die für IL-2 codierende DNA-Sequenz — mehr oder weniger — bis zum Ende nutzen und so — gegebenenfalls modifiziertes — biologisch aktives IL-2 als "Nebenprodukt" erzeugen (Deutsche Patentanmeldung P 35 45 568.3).

Die Erfindung betrifft demgegenüber solche Fusionsproteine zur Anwendung in Verfahren zur therapeutischen Behandlung des menschlichen Körpers bzw. Arzneimittel, die solche Fusionsproteine enthalten oder aus solchen Fusionsproteinen bestehen. Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft die Verwendung dieser Fusionsproteine zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung maligner Neubildungen.

Das erfindungsgemäß eingesetzte Fusionsprotein besteht also aus zwei biologisch aktiven Komponenten, und zwar einerseits aus einem IL-2-Anteil, der in an sich bekannter Weise modifiziert sein kann, und andererseits aus einem GM-CSF-Anteil, der ebenfalls modifiziert sein kann, und gegebenenfalls einem Brückenglied entsprechend der Definition Y in den vorstehend angegebenen Formeln. Vorzugsweise entspricht die Anordnung der beiden Komponenten der Formel Ia. Das erfindungsgemäße Prinzip kann auch zur Herstellung anderer neuartiger bifunktioneller Proteine dienen.

Die Figur zeigt die Konstruktion des Plasmids pB30, das für ein erfindungsgemäßes bifunktionelles Protein codiert.

Modifikationen des IL-2-Moleküls sind bekannt, wobei hier beispielhaft nur auf die europäischen Patentanmeldungen mit den Veröffentlichungsnummern (im folgenden EP-A) 00 91 539, 01 09 748, 01 18 617, 01 36 489 und 01 63 249 verwiesen sein soll. Weiterhin wurde in der deutschen Patentanmeldung P 35 37 461.6 ein IL-2-De-

riat vorgeschlagen, bei dem N-terminal die ersten sieben Aminosäuren deletiert sind. Modifikationen des GM-CSF-Moleküls wurden in der deutschen Patentanmeldung P 35 45 568.3 vorgeschlagen.

Weitere Abwandlungen der beiden aktiven Molekülanteile können in an sich bekannter Weise vorgenommen werden, wobei hier beispielhaft nur die spezifische Mutagenese erwähnt sei.

Das Brückenglied Y hat vorteilhaft die Formel II

— Asp — (As)_x — Pro —

(II)

in der x eine ganze Zahl bis zu 10 und As eine beliebige, genetisch codierbare Aminosäure mit Ausnahme von Cystein bedeuten.

Vorteilhaft ist in der Formel II am linken Ende der IL-2-Anteil und folglich am rechten Ende der GM-CSF-Anteil angeordnet.

Eine besonders bevorzugte Ausgestaltung von Y weist die Aminosäurefolge

— Asp — Pro — Met — Ile — Thr — Thr — Tyr — Ala — Asp — Asp — Pro —

auf, wobei ebenfalls vorzugsweise der IL-2-Anteil am linken Ende und der GM-CSF-Anteil am rechten Ende angeordnet sind.

Die Expression der erfindungsgemäßen bifunktionellen Proteine kann in an sich bekannter Weise erfolgen. In bakteriellen Expressionssystemen kann der Weg der Direktexpression eingeschlagen werden. Hierfür eignen sich alle bekannten Wirts-Vektor-Systeme wie Bakterien der Arten *Streptomyces*, *B. subtilis*, *Salmonella typhimurium* oder *Serratia marcescens*, insbesondere *E. coli*.

Die DNA-Sequenz, die für das gewünschte Protein codiert, wird in bekannter Weise in einen Vektor eingebaut, der in dem gewählten Expressionssystem eine gute Expression gewährleistet.

Hierbei wählt man zweckmäßig den Promotor und Operator aus der Gruppe trp, lac, tac, P_L oder P_R des Phagen λ , hsp, omp oder einen synthetischen Promotor, wie sie beispielsweise in der deutschen Offenlegungsschrift 34 30 683 bzw. in der EP-A 01 73 149 beschrieben sind. Vorteilhaft ist die tac-Promotor-Operator-Sequenz, die inzwischen handelsüblich ist (z. B. Expressionsvektor pKK223-3, Pharmacia, "Molecular Biologicals, Chemicals and Equipment for Molecular Biology", 1984, S. 63).

Bei der Expression des erfindungsgemäßen Proteins kann es sich als zweckmäßig erweisen, einzelne Triplets der ersten Aminosäuren nach dem ATG-Start-Codon zu verändern, um eine eventuelle Basenpaarung auf der Ebene der mRNA zu verhindern. Solche Veränderungen wie Deletionen oder Additionen einzelner Aminosäuren sind dem Fachmann geläufig und ebenfalls Gegenstand der Erfindung.

Für die Expression in Hefen — bevorzugt *S. cerevisiae* — verwendet man zweckmäßig ein Sekretionssystem, beispielsweise die heterologe Expression über das α -Faktor-System, das mehrfach beschrieben ist.

Für die Expression des bifunktionellen Moleküls in Hefe ist es vorteilhaft, wenn in dem bifunktionellen Protein dibasische Peptidsequenzen sowie Glykosylierungsstellen durch entsprechenden Austausch einzelner Aminosäuren zerstört werden. Hierbei ergeben sich viele Kombinationsmöglichkeiten, die auch die biologische Wirkung beeinflussen können.

Die Expression von IL-2 in Hefe ist aus der EP-A 01 42 268 bekannt, von GM-CSF aus der EP-A 01 88 350.

Die Verabreichung der erfindungsgemäßen bifunktionellen Proteine entspricht derjenigen der beiden Komponenten. Wegen der größeren Stabilität ist jedoch in vielen Fällen eine geringere Dosierung möglich, die sich im unteren Bereich der bisher vorgeschlagenen Dosierungen hält.

In den folgenden Beispielen wird die Erfindung näher erläutert. Prozentangaben und Relationen beziehen sich auf das Gewicht, sofern keine anderen Angaben gemacht sind.

Beispiel 1

Das Plasmid p159/6 (EP-A 01 63 249, Fig. 5; (1) in der vorliegenden Figur) enthält zwischen einer EcoRI- und einer Sall-Schnittstelle ein synthetisches, für IL-2 codierendes Gen. Die DNA-Sequenz für dieses Gen ist in der genannten EP-A 2 als "DNA-Sequenz I" wiedergegeben. Im Bereich der Triplets 127 und 128 befindet sich eine TaqI-Schnittstelle. Aus diesem Plasmid wird, durch Schneiden mit EcoRI und TaqI, die IL-2-Teilsequenz (2) herausgeschnitten und isoliert.

Aus der EP-A 01 83 350 ist das Plasmid pHG23 (3) bekannt, das für GM-CSF codiert. Die GM-CSF-cDNA ist in Fig. 2 dieser EP-A 2 wiedergegeben. Das Plasmid pHG23 wird erhalten, wenn man die cDNA-Sequenz in die PstI-Schnittstelle von pBR322 einbaut, wobei einerseits von der PstI-Schnittstelle beim 5'-Ende und andererseits von einer durch GC-"Tailing" eingeführten PstI-Stelle am 3'-Ende Gebrauch gemacht wird. Aus diesem Plasmid wird durch Schneiden mit SfaNI und PstI die DNA-Sequenz (4) isoliert, die den größten Teil des GM-CSF-Gens enthält.

Nach der Phosht-Methode wird das folgende Oligonukleotid (5) synthetisiert:

	128				(133)					
	Ile	Ile	Ser	Thr	Leu	Asp	Pro	Met	Ile	
5	CG	ATC	ATC	TCT	ACC	CTG	GAC	CCG	ATG	ATC
	TAG	TAG	AGA	TGG	GAC	CTG	GGC	TAC	TAG	
	(TaqI)									(5)
10								1	2	
	Thr	Thr	Tyr	Ala	Asp	Asp	Pro	(Ala)	(Pro)	
	ACC	ACC	TAT	GCG	GAC	GAT	CCG	GC		
15	TGG	TGG	ATA	CGC	CTG	CTA	GGC	CGT	GGG	
	(SfaNI)									

20 Das Oligonukleotid (5) ergänzt am 5'-Ende die DNA-Sequenz von IL-2, wobei jedoch in Position 133 anstelle von Thr Asp steht. Am 3'-Ende dieses Oligonukleotids finden sich die Nukleotide, die durch Schneiden mit SfaNI aus der cDNA weggefallen sind.

Die Herstellung des Expressionsplasmids pEW1000 (6) ist in der (nicht vorveröffentlichten) deutschen Patentanmeldung P 35 41 856.7 vorgeschlagen (Fig. 1). Dieses Plasmid ist ein Derivat des Plasmids ptac 11 (Amann et al., Gene 25 (1983) 167–178), bei dem in die Erkennungsstelle für EcoRI eine synthetische Sequenz eingebaut wurde, die eine Sall-Schnittstelle enthält. Man erhält so das Expressionsplasmid pKK 177.3. Durch Insertion des lac-Repressors (Farabaugh, Nature 274 (1978) 765–769) erhält man das Plasmid pJF118. Dieses wird an der singulären Restriktionsschnittstelle für Aval geöffnet und in bekannter Weise durch Exonuklease-Behandlung um etwa 1000 bp verkürzt und ligiert. Man erhält das Plasmid pEW1000 (6). Durch Öffnen dieses Plasmids im Polylinker mit den Enzymen EcoRI und PstI erhält man das linearisierte Expressionsplasmid (7).

30 Diese linearisierte Plasmid-DNA (7) wird nun mit dem DNA-Fragment (2), das für die IL-2-Sequenz codiert, mit dem synthetischen Oligonukleotid (5) und mit dem cDNA-Fragment (4) ligiert. Es entsteht das Plasmid pB30 (8), das in den E. coli-Stamm Mc1061 transformiert wird. Die Plasmid-DNA einzelner Klone wird isoliert und durch Restriktionsanalyse charakterisiert.

35

Beispiel 2

Kompetente Zellen des E. coli-Stammes W3110 werden mit dem Plasmid pB30 (8) transformiert. Eine Übernachtskultur des Stammes wird mit LB-Medium (J. H. Miller, Experiments in Molec. Gen., Cold Spring Harbor Lab., 1972), das 50 µg/ml Ampicillin enthält, im Verhältnis von etwa 1 : 100 verdünnt und das Wachstum über OD-Messung verfolgt. Bei OD = 0,5 wird die Kultur auf eine Konzentration von 2mM Isopropyl-β-galactopyranosid (IPTG) eingestellt und die Bakterien werden nach 150–180 Minuten abzentrifugiert. Die Bakterien werden ca. 5 Minuten in einer Puffermischung (7M Harnstoff, 0,1% SDS, 0,1M Natriumphosphat, pH 7,0) behandelt und Proben auf eine SDS-Gelelektrophoreseplatte aufgetragen. Die Expression des bifunktionellen Proteins wird so bestätigt.

Die angegebenen Bedingungen gelten für Schüttelkulturen; bei größeren Fermentationen sind entsprechend veränderte OD-Werte, Nährmedien und variierte IPTG-Konzentrationen zweckmäßig.

Beispiel 3

50 Nach Induktion werden E. coli W3110-Zellen, die das Plasmid pB30 (8) enthalten, abzentrifugiert, in Natriumphosphatpuffer (pH 7) resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Die Bakterien werden in dem gleichen Puffer aufgenommen und anschließend aufgeschlossen (French Press, Dyno-Mühle). Der Zellaufschluß wird abzentrifugiert. Überstand und Sediment werden mittels SDS-Polyacrylamidelektrophorese wie im Beispiel 2 beschrieben analysiert. Nach Anfärben der Proteinbanden zeigt sich, daß das bifunktionelle Protein im Sediment des Aufschlusses gefunden wird. Das Sediment wird mehrmals mit chaotropen Puffern und zuletzt mit Wasser gewaschen, wobei das gewünschte Protein weiter angereichert wird. In der wäßrigen Proteinsuspension wird anschließend die Proteinkonzentration bestimmt. Die Suspension wird nun auf eine Konzentration von 5M Guanidiniumhydrochlorid und 2 mM Dithiothreitol (DTT) eingestellt. Das Gemisch wird ca. 30 Minuten unter Stickstoff gerührt und anschließend mit 50 mM Tris-Puffer (pH 8,5) so verdünnt, daß die Proteinkonzentration 100 µg/ml ergibt. Nun wird gegen diesen Tris-Puffer dialysiert und nach 2maligem Pufferwechsel gegen Wasser dialysiert. Das so behandelte Protein wird steril filtriert und auf seine biologische Aktivität überprüft. Es zeigt sowohl im Interleukin-2-abhängigen CTLL-2-Zellproliferationstest als auch im humanen Knochenmarkstest volle biologische Wirkung. Gemischte Kolonien aus Granulozyten und Makrophagen werden dabei beobachtet.

65 Das bifunktionelle Protein kann über Interleukin-2-spezifische Affinitätschromatographie weiter gereinigt werden. Das Protein ist auch dann in beiden Tests aktiv. Ein E. coli-Extrakt des nichttransformierten Stammes W3110, der wie beschrieben behandelt wurde, zeigt dagegen keine Aktivität.

Für die technische Herstellung des Produktes sind andere, an sich bekannte Reinigungsverfahren zweckmäßig.

OS 37 12 985

wie Ionentausch, Adsorption, Gelfiltration und präparative HPLC-Chromatographie.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

3712985

Fig.: 10:11

Number:

37 12 985

Int. Cl.4:

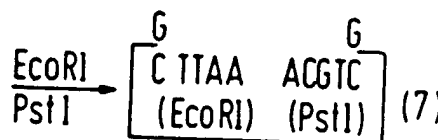
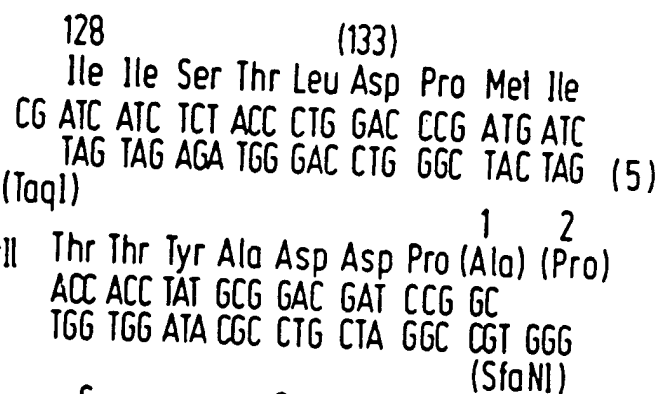
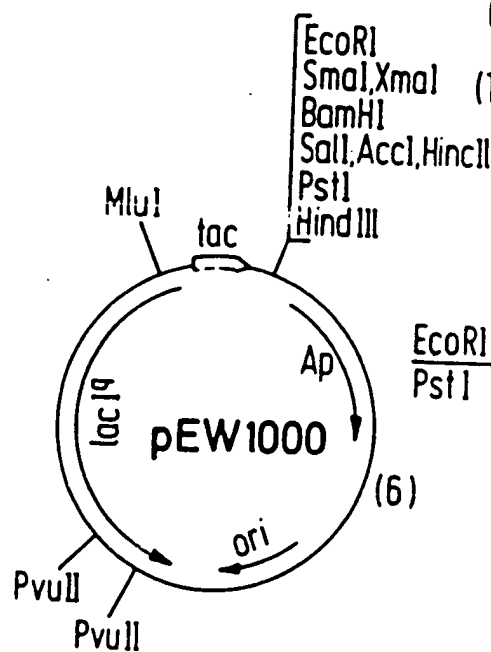
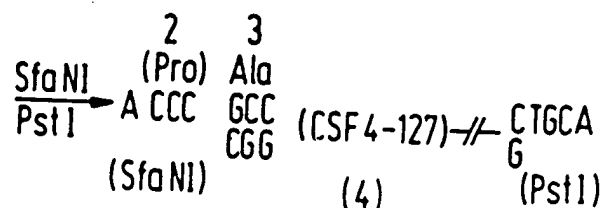
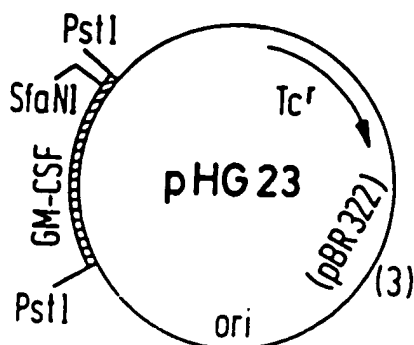
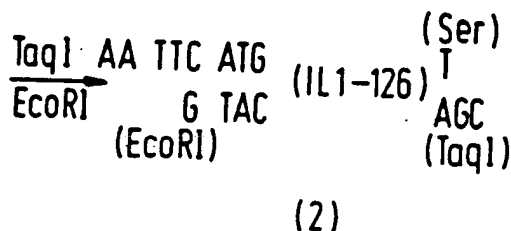
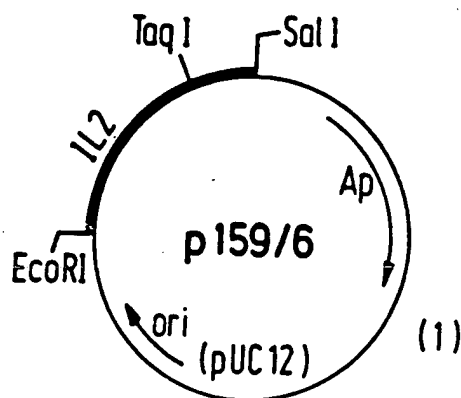
C 12 N 15/00

Anm Idetag:

16. April 1987

Offenlegungstag:

3. November 1988



(7) + (2) + (5) + (4)

